

Institut für Veterinärbakteriologie
der Vetsuisse-Fakultät Universität Zürich

Direktor: Prof. Dr. med.vet. M. M. Wittenbrink

**Western Blot Analyse der humoralen Immunantwort
von Ziegen gegen *Coxiella burnetii***

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der
Vetsuisse-Fakultät Universität Zürich

vorgelegt von

Annina Fröhlich

Tierärztin
von Brugg AG

genehmigt auf Antrag von
Prof. Dr. med.vet. M. M. Wittenbrink, Referent
Prof. Dr. med. vet. U. Bleul, Korreferent

2013

Institut für Veterinärbakteriologie
der Vetsuisse-Fakultät Universität Zürich

Direktor: Prof. Dr. med.vet. M. M. Wittenbrink

**Western Blot Analyse der humoralen Immunantwort
von Ziegen gegen *Coxiella burnetii***

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der
Vetsuisse-Fakultät Universität Zürich

vorgelegt von

Annina Fröhlich

Tierärztin
von Brugg AG

genehmigt auf Antrag von
Prof. Dr. med.vet. M. M. Wittenbrink, Referent
Prof. Dr. med. vet. U. Bleul, Korreferent

2013

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	1
Zusammenfassung	3
Summary	4
1 Einleitung	5
1.1 Taxonomie und mikrobielle Eigenschaften von <i>Coxiella burnetii</i>	5
1.2 Differenzierung von <i>Coxiella burnetii</i>	6
1.3 Epidemiologie	6
1.4 Symptomatik und Therapie bei Haustieren	8
1.5 Klinische Symptomatik beim Menschen	9
1.6 Diagnostik	9
1.6.1 Veterinärmedizinische Diagnostik	9
1.6.2 Humanmedizinische Diagnostik	10
1.7 Bekämpfung und Prävention	10
1.8 These	10
2 Material und Methoden	12
2.1 Bakterienstamm und Zellkulturen	12
2.2 Nährmedium und Puffer	12
2.3 Vermehrung von BGM-Zellen	12
2.4 Anlegen von Deckglaskulturen	13
2.5 Vermehrung von <i>C. burnetii</i> in BGM-Zellen ¹	13
2.5.1 Deckglaskulturen	13
2.5.2 Massenvermehrung in Zellkulturflaschen	13
2.6 Antigene für den Western Blot	14
2.6.1 Partielle Reinigung von <i>C. burnetii</i>	14
2.6.2 Partielle Reinigung von BGM-Zellen	14
2.6.3 Bestimmung der Proteinkonzentration	15
2.6.4 Statistik	15
2.7 Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE)	16
2.8 Western Blot	18
2.9 Seren	20

3	Resultate	21
3.1	Coxiellen- und BGM-Antigen	21
3.2	Kontrollseren	21
3.3	ELISA	22
3.4	Western Blot	22
3.5	Reaktion mit BGM-Zellen	24
3.6	Vergleich von ELISA und Western Blot	25
4	Diskussion	26
5	Referenzen	31
	Danksagung	36
	Curriculum vitae	37
	Anhang: Abkürzungsverzeichnis	38

Zusammenfassung

Mit einem Western Blot wurde die humorale Immunantwort von Ziegen mit einer natürlichen *Coxiella (C.) burnetii*-Infektion untersucht. Das Probenkollektiv umfasste 61 Ziegenserum, wovon 48 Seren im ELISA *C. burnetii*-Antikörper aufwiesen (CHEKIT Q-Fever ELISA Kit, Fa. IDEXX). Als Antigen für den Western Blot wurde der Stamm *C. burnetii* Nine Mile I in BGM (Buffalo green monkey)-Zellen vermehrt und durch differentielle Zentrifugation gereinigt. Zwischen der Höhe der ELISA-OD-Werte und der Anzahl der reaktiven Antigenbanden im Western Blot bestand eine signifikante Korrelation. Die Western Blot-Analyse der 48 ELISA-positiven Ziegenserum ergab eine hohe Diversität an Reaktionsmustern, die 3 Gruppen zugeordnet werden konnten. Ob diese Reaktionsmuster unterschiedliche Infektionsstadien anzeigen, bleibt offen, da es bisher keine Western Blot Analysen zum Verlauf der humoralen Immunantwort bei Tieren gibt.

Die vorliegende Arbeit diente zur Erlangung grundlegender Erkenntnisse über die Western Blot Reaktivität von Immunsereum natürlich *C. burnetii*-infizierter Ziegen. Der beschriebene Nachweis spezifischer Western Blot-Reaktionsmuster könnte zu einer zukünftig verbesserten Serodiagnostik der Coxiellose der Ziege beitragen.

Summary

The humoral immune response of goats infected naturally with *Coxiella (C.) burnetii* was analyzed by means of a Western blot. Sixty one goat sera were investigated; forty eight of which demonstrated antibody-reactivity against *C. burnetii* in the ELISA (CHEKIT Q-Fever Elisa Kit, IDEXX). Strain *C. burnetii* Nine Mile I was cultivated in BGM-cells and subsequently purified by differential centrifugation, in view of use as an antigen for the Western blot. A significant correlation between the level of OD values and the amount of reactive antigen bands in the Western blot could be determined. The Western blot analysis of the 48 ELISA-positive goat sera displayed a high diversity of reaction patterns which could be divided into 3 groups. Whether these reaction patterns are associated to the different stages of infection remains unclear, because to date, no Western blot studies on the course of animal's humoral immune response have been carried out.

The present study served to gain fundamental knowledge on the Western blot reactivity of immunsera of naturally infected goats. The described proof of specific Western blot reaction patterns could contribute to an improvement of coxiellosis serodiagnostics in goats, in the future.

1 Einleitung

1.1 Taxonomie und mikrobielle Eigenschaften von *Coxiella burnetii*

Die Coxiellen werden der Klasse der γ -*Proteobacteria* zugeteilt und gehören zur Ordnung der *Legionellales*, die wiederum aus zwei Familien besteht: den *Legionellaceae*, denen der Erreger der Legionärskrankheit des Menschen angehört, und den *Coxiellaceae* mit der einzigen Gattung *Coxiella*. Die Gattung *Coxiella* enthält nur eine Art, *Coxiella (C.) burnetii*, den Erreger der Coxiellose der Tiere und des Q-Fiebers beim Menschen.

C. burnetii ist ein pleomorphes Stäbchen mit einer Grösse von maximal 0.4 μm x 1 μm . Obschon Coxiellen eine den gramnegativen Bakterien ähnliche Zellwand aufweisen, färben sie sich in der Gram-Färbung unzuverlässig an. Mit Spezialfärbungen wie der Gimenez- oder Stamp-Färbung lassen sie sich aber lichtmikroskopisch sehr gut darstellen.

Lange galten Coxiellen als obligat intrazellulär, bis es 2009 gelang, sie in einem axenischen Medium zu züchten (Omsland et al. 2009). Üblicherweise setzt man zur Coxiellenanzucht BGM-Zellen ein, auf denen sie sich bei sachgerechter Handhabung über Jahre hinweg vermehren lassen (Arens 1983).

C. burnetii werden durch Endozytose in die Wirtszelle aufgenommen, wo sie im sauren Milieu der Phagolysosomen optimale Vermehrungsbedingungen vorfinden (Hackstadt et Williams 1981). Unter dem Einfluss bakterieneigener Effektorproteine bilden sich im Zytoplasma der infizierten Zellen sogenannte Vakuolen, in denen die Bakterien in dichten Gruppen nachweisbar sind (Arens 1983). Dabei lassen sich kleine kokkoide Formen (Small-cell variants, SCV) von grösseren pleomorphen Formen unterscheiden (Large-cell variants, LCV). Die SCV sind äusserst widerstandsfähige, in der Aussenwelt lange überlebensfähige infektiöse Stadien; die LCV sind die stoffwechselaktiven teilungsfähigen Stadien. Die SCV besitzen dementsprechend eine relativ dicke, gegen Umwelteinflüsse sehr resistente Zellwand, die sich oft grampositiv anfärbt. Die LCV dagegen haben eine dünne, fragile Zellwand mit wenig quervernetztem Peptidoglycan und färben sich gramnegativ. Coxiellen zeigen also ein gramlabiles Färbeverhalten.

C. burnetii durchläuft eine Antigen-Phasen-Variation. Die virulenten Phase I Organismen, die aus natürlich infizierten Wirten isoliert werden, können nach mehreren Passagen in embryonierten Hühnereiern oder Zellkulturen zu Phase II Organismen konvertieren, die nur schwach virulent sind. Ursache dieser Virulenzverminderung ist eine chromosomale Deletion, die zu partiellem LPS-Verlust führt. Phase I Formen verfügen über ein glattes LPS,

das sie resistent gegenüber Komplement macht und vor endolysosomalem Abbau schützt, während Phase II Formen ein rauhes LPS aufweisen (durch Verlust des polymeren O-Antigens) und dadurch zu obigen Mechanismen nicht in der Lage sind. Der Unterschied in der LPS-Struktur der beiden Phasen wird serologisch zur Differenzierung von akuten und chronischen Infektionen genutzt (Hackstadt 1990).

Coxiellen besitzen eine sehr hohe Tenazität gegenüber zahlreichen Stressfaktoren wie Hitze, UV, Austrocknung, Druck und osmotischem Stress (Seshadri et al. 2003), die massgeblich auf der äusserst stabilen Zellwandstruktur der SCV beruht. So können sie in eingetrockneten Geburtsprodukten, Sekreten und Exkreten oder Zeckenkot (z.B. in Schafwolle und Staub) bei normalen Umgebungstemperaturen über Monate infektiös bleiben. Temperaturen über 70°C (Cerf et Condron 2006) und direktes intensives UV-Licht (Little et al. 1980) töten den Erreger innert weniger Minuten ab.

1.2 Differenzierung von *Coxiella burnetii*

Von *C. burnetii* existieren viele verschiedene Stämme, die sich zum Teil in ihrer Virulenz unterscheiden (Samuel et al. 1985). Sie können aufgrund verschiedener DNA-Muster (nach Restriktionsendonuklease-Verdau und Auftrennung mittels SDS-PAGE) in sechs genomische Gruppen eingeteilt werden. (Hendrix et al. 1991) Weiter kann man sie anhand von Plasmidanalysen in drei unterschiedliche Plasmidgruppen und eine plasmidlose Gruppe einteilen (Frazier et al. 1990). Die jeweilige Gruppenzugehörigkeit korreliert mit unterschiedlicher Virulenz (Samuel et al. 1985).

Sekeyova et al. (2006) zeigten, dass sich verschiedene *C. burnetii*-Stämme mittels monoklonaler AK im Western Blot unterscheiden lassen. Die verschiedenen Stämme unterschieden sich sowohl bezüglich der Bandenmuster als auch in der Intensität der Banden.

1.3 Epidemiologie

Das Q-Fieber ist eine weltweit verbreitete Zoonose. Das Wirtsspektrum ist sehr breit und umfasst neben Wildtieren wie Nagetiere, Füchse, Paarhufer, Vögel und Reptilien alle Haustierarten. Wichtigstes Erregerreservoir im Naturherd sind Zecken, die die Coxiellen transovarial auf ihre Nachkommen übertragen und Wirtstiere durch erregerhaltigen Kot oder beim Blutsaugen via Speichel infizieren.

Neben dem Naturherdzyklus existiert ein Wildtier-unabhängiger Haustierzyklus, der als endemisches Geschehen durch direkte Tier zu Tier Übertragung aufrechterhalten wird und die wichtigste Ansteckungsquelle für den Menschen darstellt. Der Mensch selbst ist hochempfindlich für eine *C. burnetii*-Infektion. Bereits sehr geringe Infektiositätsdosen von 1-10 Erregern reichen für das Angehen einer Infektion. Unter den Haustieren sind in erster Linie Rinder, Schafe und Ziegen betroffen.

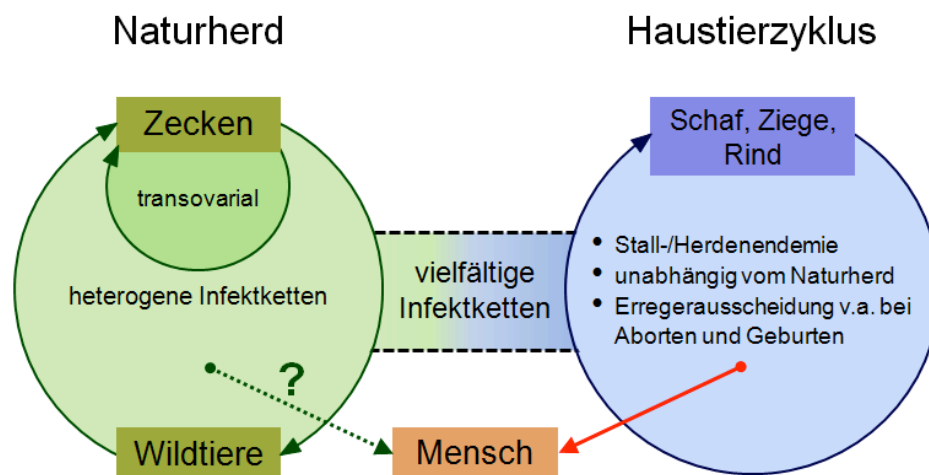


Abbildung 1. Epidemiologie der *Coxiella burnetii*-Infektionen

Bei infizierten weiblichen Tieren besiedelt der Erreger hauptsächlich die Gebärmutter und die Milchdrüse. Bei einem coxielleninduzierten Abort werden massenhaft Coxiellen ausgeschieden. Auch bei normalen Geburten können die Geburtsprodukte abhängig vom Immunstatus des Tieres mehr oder weniger hohe Erregermengen enthalten. Der Erreger findet sich zudem auch in Kot, Urin oder Sekreten des Respirationstraktes. Entstehende Aerosole und kontaminierter Staub stellen die Hauptinfektionsquelle für Mensch und Tier dar. Infektionen wurden bis zu 2 km entfernt von infizierten Tierherden verzeichnet. Eine Übertragung auf den Menschen ist auch durch den Konsum von Rohmilch infizierter Rinder, Schafe oder Ziegen möglich (Anonym 2002).

In der Schweiz ist die Prävalenz der Coxiellose der Rinder, Schafe und Ziegen insgesamt eher niedrig. Ein wichtiger Parameter zur Schätzung der Prävalenz ist die Anzahl der jährlich gemeldeten *C. burnetii* Aborte. Hierzulande werden beim Rind jährlich 30-60 Fälle, bei Schaf und Ziege hingegen nur Einzelfälle gemeldet. Diese Situation spiegelt sich auch in Daten zur

Seroprävalenz des Erregers wider: Diese beträgt bei Rindern etwa 30% (Wittenbrink 2009 Zoonosebericht BVET), bei Ziegen liegt sie bei 3.4% und bei Schafen noch etwas tiefer bei 1.8% (Hunninghaus). Über die Häufigkeit des Q-Fiebers liegen keine validen Daten vor, da Einzelerkrankungen des Menschen in der Schweiz nicht meldepflichtig sind.

1.4 Symptomatik und Therapie bei Haustieren

Die Coxiellose der Haustiere verläuft in den meisten Fällen inapparent (Marrie 1990). Wichtigste klinische Manifestationen, vor allem bei Wiederkäuern, sind Spätaborte, Frühgeburten, Infertilität und die Geburt lebensschwacher Jungtiere (Brecht et Hess 1964). Ursache dafür ist die Affinität von *C. burnetii* zum graviden Uterus (Sanchez et al. 2006) wo eine Plazentitis ausgelöst wird (Sanford et al. 1994).

Bei Schafen und Ziegen führt eine Erstinfektion der Herde zu seuchenhaftem Verlammen (Waldhalm et al. 1978). Nach einer Infektion ist bei Schafen, Ziegen und Kühen eine monatelange Ausscheidung über die Milch, aber auch über Kot und Vaginalsekret ohne klinische Symptome möglich (Rodolakis 2009). Zur Reduktion der Erregerausscheidung bei Bestandesproblemen kommen Tetracycline und prophylaktische Vakzinationen zum Einsatz. Aborte und Fruchtbarkeitsstörungen wurden auch bei Hunden (Buhariwalla et al. 2009) und Katzen (Marrie et al. 1988) beschrieben, jedoch verläuft die Infektion auch hier meist asymptomatisch. Therapeutisch wurde erfolgreich Minocyclin eingesetzt, ein Antibiotikum der Tetracyclingruppe (Komiya et al. 2003).

Die Coxiellose der Ziege ist relativ gut untersucht. Bei Infektion einer naiven Ziegenherde tritt bei einem Teil der Tiere 3-7 Tage p.i. Fieber auf. Ab Tag 21 p.i. kommt es zur Serokonversion. Neben Totgeburten (Spätaborte) und Geburten lebensschwacher Jungtiere kann sich bei Ziegen auch eine Pneumonie entwickeln. Aborte bei Erstinfektion können bei bis zu 90% aller tragenden Tiere einer Herde auftreten. Ziegen können chronisch infiziert bleiben und Coxiellen über lange Zeit, das heisst über mehrere Ablammsaisons in der Milch, im Kot und im Vaginalsekret ausscheiden. Die Ausscheidung erfolgt unabhängig von klinischen Symptomen, jedoch sind bei chronisch infizierten Ziegen Aborte in zwei aufeinanderfolgenden Ablammsaisons möglich. (Berri et al. 2007) Interessanterweise können auch seronegative Ziegen Ausscheider sein, so waren in einer Studie in Frankreich 25% der Coxiellen-ausscheidenden Ziegen seronegativ. (Rousset et al. 2009)

1.5 Klinische Symptomatik beim Menschen

C. burnetii verursacht beim Menschen das Q-Fieber, das akut oder chronisch verlaufen kann, wobei mindestens 50% der Infektionen asymptomatisch verlaufen. Die akute Infektion äussert sich nach einer Inkubationszeit von 3-30 Tagen in hohem Fieber, starken Kopfschmerzen, teilweise auch Übelkeit und Erbrechen, Diarrhoe und starker Abgeschlagenheit. 1-2% der Erkrankten entwickelt eine atypische Pneumonie. Bei einer Infektion während der Schwangerschaft kann es zu Aborten und Frühgeburten kommen. Die akute Krankheit ist häufig selbstlimitierend und hinterlässt eine langanhaltende Immunität. (Angelakis 2010). Die antibakterielle Therapie des akuten Q-Fiebers besteht z.B. in der Gabe von Doxycyclin, 100 mg 2 x täglich über einen Zeitraum von 14 Tagen (Carcopino et al. 2009). Bei 5-15% der Infizierten geht das akute Q-Fieber in die chronische Form über. Prädisponierend sind Immundefizienz oder bestehende Herzklappendefekte. Die chronische Form manifestiert sich als Endokarditis, chronische Müdigkeit, Hepatitis oder Meningitis (Karakousis et al. 2006). Eine Therapie erfolgt mit einer Kombination von Doxycyclin und Hydroxychloroquin über längere Zeit (18-36 Monate) unter ärztlicher Überwachung (Carcopino et al. 2009). Beide Medikamente sind während der Schwangerschaft kontraindiziert, hier erweist sich aber Cotrimoxazol als Langzeittherapie über die Dauer der gesamten Schwangerschaft als effektiv (Carcopino et al. 2007).

1.6 Diagnostik

Da die durch *C. burnetii* hervorgerufenen Symptome auch bei zahlreichen anderen Erkrankungen auftreten können, ist ein direkter oder indirekter Erregernachweis für die ätiologische Diagnose unabdingbar.

1.6.1 Veterinärmedizinische Diagnostik

Die Labordiagnostik bei Wiederkäueraborten besteht im direkten mikroskopischen Nachweis der Erreger von Abstrichen oder histologischen Schnitten des Abortmaterials. Die Proben werden nach Gimenez gefärbt, wodurch Coxiellen selektiv angefärbt und unter dem Mikroskop als kleine rote pleomorphe Stäbchen nachweisbar sind. Weiter können Coxiellen in verschiedenen Matrices (Aborte, Lochialfluss, Milch, Kot u.a.) mittels PCR nachgewiesen

werden. Eine Kultivierung ist aufwändig, erfordert ein Biosicherheitslabor der Stufe 3 und wird nicht routinemässig durchgeführt.

Der indirekte Erregernachweis erfolgt durch den Nachweis spezifischer Antikörper im Serum des infektionsverdächtigen Tieres. Der ELISA wird vorrangig zur Ermittlung der Seroprävalenz in Herden eingesetzt. Über die Eignung des Western Blots für die Serologie am Tier liegen bis auf einen Bericht keine Erfahrungen vor (Willems et al. 1992)

1.6.2 Humanmedizinische Diagnostik

In der Humanmedizin ist es wichtig, akut Infizierte von chronisch Infizierten zu unterscheiden. Dies geschieht mittels serologischer Verfahren über den Vergleich der Menge an Phase I-Antikörpern mit der Menge an Phase II-Antikörpern. Bei einer akuten Form herrschen Antikörper gegen Phase II vor, während bei der chronischen Form vor allem Antikörper gegen Phase I nachweisbar sind (Tissot-Dupont et al. 1994).

1.7 Bekämpfung und Prävention

Die Coxiellose ist nach Schweizer Tierseuchenrecht eine zu überwachende Seuche und beim Wiederkäuer meldepflichtig.

Jeder Abort von Schafen, Ziegen oder Rindern muss dem Tierarzt gemeldet werden. Verwirft mehr als ein Tier innerhalb eines Zeitraumes von vier Monaten, muss das Abortmaterial unter anderem auf *C. burnetii* untersucht werden.

Vorbeugend sollten Wiederkäuer im letzten Trächtigkeitsdrittel nicht mehr in Kontakt mit Besuchern landwirtschaftlicher Ausstellungen oder Streichelzoos gebracht werden, um grossräumige Ausbrüche zu vermeiden. Weiter wird empfohlen, die Tiere zum Gebären in separate Boxen zu stellen und Abortmaterial und Nachgeburten in verschlossenen Behältern über die Tierkörpersammelstelle zu entsorgen (BVET Coxiellose/Q-Fieber 2013).

Es existieren Impfstoffe gegen *C. burnetii*, sie sind allerdings in der Schweiz nicht zugelassen (BVET Coxiellose/Q-Fieber 2013).

1.8 These

Die Analyse der humoralen Immunantwort von natürlich infizierten Ziegen gegen *C. burnetii* mittels Western Blot ergibt reproduzierbare Bandenmuster, die als *C. burnetii* spezifisch angesehen werden können.

Die vorliegende Arbeit diene zur Erlangung grundlegender Erkenntnisse über die Western Blot Reaktivität von Immunseren natürlich *C. burnetii*-infizierter Ziegen.

2 Material und Methoden

2.1 Bakterienstamm und Zellkulturen

Es wurde der Stamm *C. burnetii* Nine Mile I verwendet. Der Stamm wurde in kryoprotektivem Medium bei -80°C aufbewahrt. Die Buffalo-Green-Monkey- (BGM) Zellen, eine permanente Zelllinie aus der Niere der Grünen Meerkatze (*Chlorocebus aethiops*, Barron et al. 1970) wurden laufend passagiert und lagen zudem als Kryoreserven bei -80°C vor.

2.2 Nährmedium und Puffer

Als Zellkulturmedium diente Eagles Minimum Essential Medium (EMEM) mit Earle's Salzen und 20 ml HEPES (Fa. Biochrom) sowie folgenden Zusätzen (ad 500 ml EMEM): 5 ml MEM Vitamine 100x (Fa. Biochrom), 5 ml L-Glutamin (Fa. Biochrom), 6 ml Natriumbicarbonat 7.5% (Fa. Biochrom), 25 ml fetales Kälberserum entspr. 5% f.c., Fa. PPA Laboratories).

Zur Passagierung von Zellkulturen wurden PBS nach Dulbecco (Fa. Sigma) und Trypsin 0.25% mit 0.02% EDTA (Fa. SAFC Biosciences) verwendet. Zellkulturmedium und Puffer wurden bei +4°C gelagert und vor Anwendung in der Zellkultur im Wasserbad auf 37°C erwärmt.

2.3 Vermehrung von BGM-Zellen (Barron et al. 1970)

BGM-Zellen wurden in stationären Kulturen (Zellkultufaschen Cellstar, Fa. Greiner bio-one) vermehrt. Einmal pro Woche wurden die Zellen nach folgendem Schema passagiert:

- Medium aus bewachsenen Zellkulturflaschen abgiessen
- Zellen mit je 10 ml PBS zweimal waschen
- Trypsin zugeben (die Zellen sollen mit einem dünnen Flüssigkeitsfilm bedeckt sein)
- Zellen bei 37°C 5-10 min inkubieren. Danach noch haftende Zellen durch leichtes Schütteln in Suspension bringen
- Pro ml an zugegebenem Trypsin 0.5 ml EMEM mit Serumzusatz zugeben und Inhalt der Flaschen in ein Zentrifugenröhrchen geben
- Zellsuspension 10 min mit 500 x g bei 20°C zentrifugieren
- Überstand abgiessen, Zellpellet in frischem Medium resuspendieren
- Zellzahl/ml Medium mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer (improved) bestimmen und Einsaatdichte auf ca. 10^5 Zellen je ml Wachstumsmedium einstellen
- Die Zellkulturen bei 37°C unter 5% CO₂ bebrüten

- Die Zellkulturen täglich makroskopisch und mikroskopisch kontrollieren und die Befunde protokollieren

2.4 Anlegen von Deckglaskulturen

Zur Anzucht von *C. burnetii* Isolate wurden BGM-Deckglaskulturen verwendet. Diese wurden wie folgt angelegt:

- Zellzahl der BGM-Zellsuspension auf ca. 250 000 Zellen pro ml Medium einstellen
- In Zellkulturröhrchen je ein rundes autoklaviertes Deckgläschen (12 mm Ø) geben
- Je 1 ml der Zellsuspension in die Deckglaskulturröhrchen geben
- Bei 37 °C inkubieren

Nach ca. 24 h sind die Deckgläschen mit einem dichten, einschichtigen Zellrasen bewachsen und können beimpft werden.

2.5 Vermehrung von *C. burnetii* in BGM-Zellen (Barron 1970, Horschler 1987, Lindl 2000)

2.5.1 Deckglaskulturen

Alle Arbeiten zur Vermehrung von Coxiellen wurden im institutseigenen BL-3 Labor durchgeführt.

- Das Zellkulturmedium aus den Deckglaskulturen in ein steriles Röhrchen abkippen und mit dem aufgetauten *C. burnetii* Stamm versetzen
- Von der gründlich durchmischten Bakteriensuspension je 1 ml in die Zellkulturröhrchen geben
- Röhrchen 60 min mit 2000 x g bei Raumtemperatur zentrifugieren
- 24 h bei 37°C inkubieren
- Nach 24 h Medium abgiessen, Zellen 2x mit je 2 ml vorgewärmtem PBS waschen und je 2 ml frisches Zellkulturmedium zugeben
- 7 Tage bei 37°C inkubieren und täglich auf dem Invertmikroskop auf die Bildung typischer CPE untersuchen

2.5.2 Massenvermehrung in Zellkulturflaschen

- Nach 7 Tagen Wachstum in Deckglaskultur wurden die Coxiellen sukzessive in grösseren Zellkulturflaschen vermehrt. Dabei wurde wie folgt vorgegangen:

- Die zu verimpfende Deckglaskultur kurz bei -20°C einfrieren und anschliessend während dem Auftauen schütteln, sodass die Zellen lysiert und die Coxiellen freigesetzt werden
- Das Medium der Zellkulturflasche abgiessen bis die Zellen noch mit einem dünnen Flüssigkeitsfilm bedeckt sind
- Den Überstand der Deckglaskultur in die Zellkulturflasche geben und die beimpfte Flasche mindestens 3 h bei 37°C inkubieren
- Zellkulturmedium zugeben (für eine 75 cm² Flasche 20 ml) und bei 37°C inkubieren

Die Zellkulturen wurden bis zur Bildung hochgradiger CPE in den BGM-Zellen bebrütet. Anschliessend wurde der coxiellenhaltige Überstand bei -20°C eingefroren und neues Medium in die Zellkulturflasche gegeben.

2.6 Antigene für den Western Blot

2.6.1 Partielle Reinigung von *C. burnetii*

Die Überstände der *C. burnetii*-infizierten Zellkulturen wurden für die Verwendung im Western Blot durch differentielle Zentrifugation wie folgt aufgereinigt:

- Überstände aus der Zellkultur 45 min mit 17'700 x g bei 4°C zentrifugieren (Sorvall Zentrifuge RC-6 Plus, Rotor: Fiber Lite F10-6 x 500y)
- Überstand verwerfen, Sediment in 150 ml PBS resuspendieren
- 45 min mit 17'700 x g bei 4°C zentrifugieren
- Überstand verwerfen, Sediment in 40 ml PBS resuspendieren
- ca. 2 min mit Ultraschall homogenisieren
- 10 min mit 1000 x g bei 4°C zentrifugieren
- Überstand aufbewahren, Sediment in 40 ml PBS resuspendieren
- ca. 1 min mit Ultraschall homogenisieren
- 10 min mit 1000 x g bei 4°C zentrifugieren
- Überstand gewinnen und mit dem aufbewahrten Überstand mischen
- 45 min mit 17'700 x g bei 4°C zentrifugieren
- Überstand verwerfen, Sediment in 6 ml PBS resuspendieren und bei -80°C einfrieren

2.6.2 Partielle Reinigung von BGM-Zellen

- Suspension 1h mit 20'000 x g bei 4°C zentrifugieren
- Überstand verwerfen, Sediment mit Ultraschall in 4 ml PBS resuspendieren und 20 min mit 1500 x g bei 4°C zentrifugieren

- Überstand abnehmen und bei 4°C aufbewahren. Sediment mit Ultraschall in 2 ml PBS resuspendieren und 20 min mit 1500 x g bei 4°C zentrifugieren
- Überstand abnehmen und bei 4°C aufbewahren. Sediment mit Ultraschall in 2 ml PBS resuspendieren und 20 min mit 2000 x g bei 4°C zentrifugieren
- Überstand abnehmen. Die vereinigten Überstände 1h mit 20'000 x g bei 4°C zentrifugieren.
- Sediment mit Ultraschall in 50 ml PBS resuspendieren und erneut 1h mit 20'000 x g bei 4°C zentrifugieren.
- Sediment in maximal 1/100 Ausgangsvolumen PBS resuspendieren und bei -80°C aufbewahren

2.6.3 Bestimmung der Proteinkonzentration

Aliquots des Coxiellen- und des BGM-Antigens (2.6.1 und 2.6.2) wurden jeweils 3x 15 sec auf Eis mit hochfrequentem Ultraschall lysiert. Der Proteingehalt der beiden Antigene wurde mit dem Bradford-Verfahren (Bradford 1976) unter Verwendung eines Standards aus bovinem Serumalbumin bestimmt (Bio Rad Protein Assay Dye Reagent, Fa. Biorad).

2.6.4 Statistik

Statistische Analysen (lineare Regressionsanalysen) wurden mit SigmaStat® Software Version 3.5 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) durchgeführt. Grafiken wurden mit der Software OriginLab™ Version 9.0 (OriginLab Corp. Northampton, MA, USA) erstellt.

2.7 Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE)

Material:

30% Acrylamid -/0.8% Bisacrylamidlösung (Fa. Roth)

Trenngelpuffer:

91 g Tris, 400 ml A. bidest. Tris auflösen, mit HCl auf pH 8.8 einstellen. 20 ml SDS 10% beifügen. Mit A. bidest. auf 500 ml auffüllen.

Sammelgelpuffer:

15.25 g Tris, 150 ml A. bidest. Tris auflösen, mit HCl auf pH 6.8 einstellen. 10 ml SDS 10% beifügen. Mit A. bidest. auf 250 ml auffüllen.

Probenpuffer (6x):

5 ml Glycerin 87%

2.5 ml β -2-Mercaptoethanol

15 ml SDS 10%

6.25 ml Sammelgelpuffer

12.5 mg Bromphenolblau (Firma Merck)

Ad 50 ml mit A. bidest. auffüllen

Laufpuffer (10x):

10x Laufpuffer

30.28 g Tris

144.14 g Glycin

Ad 1000ml mit A. bidest. Auffüllen

Laufpuffer (1x):

100ml 10x Laufpuffer

10 ml SDS 10%

Ad 1000 ml mit A. bidest. auffüllen

10 % Ammoniumpersulfat:

1 g Ammoniumpersulfat in 10 ml A. bidest. lösen. Als 500 µl-Aliquots bei -20°C lagern

TEMED (Fa. Biorad)

Trenngel (10% SDS-Gel, 82 x 82 x 0.75 mm):

8.4 ml 30% Acrylamid-/0.8% Bisacrylamidlösung

6.5 ml Trenngelpuffer

10 ml A. bidest.

15 µl TEMED

200 µl Ammoniumpersulfat

Das Gel wird zum Polymerisieren mit absolutem Ethanol überschichtet. Nach Polymerisation (ca. 30 min) wird das Ethanol mit Filterpapier entfernt und das Sammelgel eingefüllt.

Sammelgel:

0.5 ml 30% Acrylamid-/0.8% Bisacrylamidlösung

1.25 ml Sammelgelpuffer

3.25 ml A. bidest.

10 µl TEMED

20 µl Ammoniumpersulfat

In das Sammelgel werden die Kämme eingesetzt. Die Polymerisationszeit beträgt wiederum ca. 30 min. Laufbedingungen: Sammelgel 50 V, ca. 30 min, Trenngel 100 V, ca. 90 min.

Antigen:

Coxiella- s. BGM-Antigen im Verhältnis von 5 : 1 mit Probenpuffer mischen und 10 min kochen (max. Einfüllvolumen der Geltaschen ca. 15 µl).

Marker:

Prestained Protein Marker Broad Range (7-175 kDa) (Fa. BioLabs)

Geräte:

Mini Trans Blot (F. Biorad), Power Pac 300 (Fa. Biorad)

2.8 Western Blot

Material:

Transferpuffer:

100 ml 10x Laufpuffer

150 ml Methanol

Ad 1000 ml mit A. bidest. auffüllen

TBS 10 x

24.23 g Tris

292 g NaCl

Ad 1000 ml mit A. bidest. auffüllen. Für die Anwendung 1:10 verdünnen.

TBS-Tween:

1 x TBS mit 0.05% Tween 20 (Fa. Merck)

Blockingpuffer:

5% Magermilchpulver (Skim milk powder, Fa. Fluka) in 1x TBS

Blockingpuffer für Seruminkubation:

1% Magermilchpulver in 1x TBS

4-Chloro-1-naphtol-Stammlösung:

1.2 g 4-Chloro-1-naphtol (Fa. Sigma) in 40 ml Methanol lösen. Bei -20°C lagern.

Entwicklerlösung A:

1ml 4-Chloro-1-naphtol-Stammlösung in 9 ml Methanol (eiskalt)

Entwicklerlösung B

50 ml TBS (eiskalt) + 30 µl H₂O₂

Gerät: Trans Blot Semidry transfer cell (Fa. Biorad)

Methode:

Blotting im Semidry-Verfahren:

- Gel in Transferpuffer äquilibrieren
- 3 feuchte in Transferpuffer äquilibrierte Filterpapiere auf die Anodenplatte legen; mit Stielroller Luftblasen entfernen
- Blotting Membran (PVDF-Folien) 1 min in Methanol einlegen. Danach in Transferpuffer anfeuchten und auf die Filterpapiere legen
- äquilibriertes Gel auf die Membran legen, Luftblasen entfernen
- 3 feuchte in Transferpuffer äquilibrierte Filterpapiere auf das Gel legen, mit Stielroller Luftblasen entfernen
- Laufbedingungen: 10 Volt, 30 min

Immunologische Detektion:

- Blots 1h auf dem Schüttler bei Raumtemperatur in Blockingpuffer inkubieren
- Über Nacht mit 1:50 in Blockingpuffer verdünntem Ziegenserum bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubieren
- 2 x 10 min mit TBS waschen
- 2h mit 1:2000 in Blockingpuffer verdünntem Peroxidase-konjugiertem Sekundäantikörper (Rabbit-anti-Goat-IgG-Peroxidase, Fa.Sigma) bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubieren
- 2 x 10 min mit TBS-Tween und 2 x 10 min mit TBS waschen
- Entwicklerlösungen A und B getrennt ansetzen und gleichzeitig in Entwicklerbox (lichtundurchlässig) füllen. Membran entwickeln, bis deutliche Banden sichtbar sind (ca. 20-30 min)
- Farbreaktion mit A. bidest. stoppen und Membran trocknen lassen

2.9 Seren

Aus der Serumbank des Instituts wurden willkürlich 61 Ziegenserum für die Untersuchung entnommen. Die Seren wurden im ELISA auf Antikörper gegen Coxiellen untersucht (CHEKIT Q-Fever ELISA Kit, Fa. IDEXX). Die Seren wurden bei -20°C aufbewahrt.

Ein positives Kontrollserum wurde durch Immunisierung einer Ziege mit dem kommerziellen inaktivierten Coxiellenimpfstoff Coxevac (Fa. Ceva) gewonnen. Für diese Immunisierung lag eine Genehmigung (Versuch Nr. 121/2011) des Veterinäramtes des Kantons Zürich vor. Die Negativkontrollen des ELISA dienten zur Berechnung des cut-off-Wertes.

Vor der Erstimmunisierung wurde dem klinisch gesunden Tier Blut zur Gewinnung des Nullserums entnommen. Anschliessend erfolgte die dreimalige subkutane Impfung im Abstand von 4-6 Wochen. Vor der 2. und 3. Impfung wurde eine Blutprobe zur Kontrolle der Antikörperbildung entnommen. Drei Wochen nach der letzten Immunisierung wurden dem Tier ca. 50 ml Blut zur Serumgewinnung entnommen. Das negative und positive Kontrollserum wurde in Aliquots bei -20°C aufbewahrt.

3 Resultate

3.1 Coxiellen- und BGM-Antigen

Durch die partielle Reinigung von etwa 2.5 L coxielleninfizierter BGM-Zellsuspension bzw. nicht infizierter BGM-Zellen konnten Antigene mit einem Proteingehalt von 4.5 mg/ml (*Coxiella*-Antigen) bzw. 0.5 mg/ml (BGM-Antigen) hergestellt werden. Die Antigene wurden bis zur Durchführung des Western Blot bei -80°C aufbewahrt.

3.2 Kontrollseren

Im Präimmunisierungsserum der Ziege waren im ELISA keine spezifischen Antikörper nachweisbar (OD_{450} 0.056). Im Western Blot wies dieses Serum geringgradige Reaktivitäten insbesondere mit drei Partialantigenen von 42, 29 und 25 kDa auf. (Abb. 1 A). Vier Wochen nach der Erstimmunisierung war im Blutserum mittels ELISA eine deutliche *C. burnetii*-spezifische positive Reaktion nachweisbar (OD_{450} 0.699). Diese Serokonversion konnte im Western Blot bestätigt werden: Das Serum reagierte jetzt mit insgesamt acht verschiedenen Partialantigenen in den Grössen von 63.7, 42, 30.6, 29.7, 29.2, 28.5, 26, 25.3 kDa (Abb. 1 B, C). Das Prä- und die Postimmunisierungsseren der Ziege waren somit als Kontrollseren zur Etablierung des Western Blot geeignet.

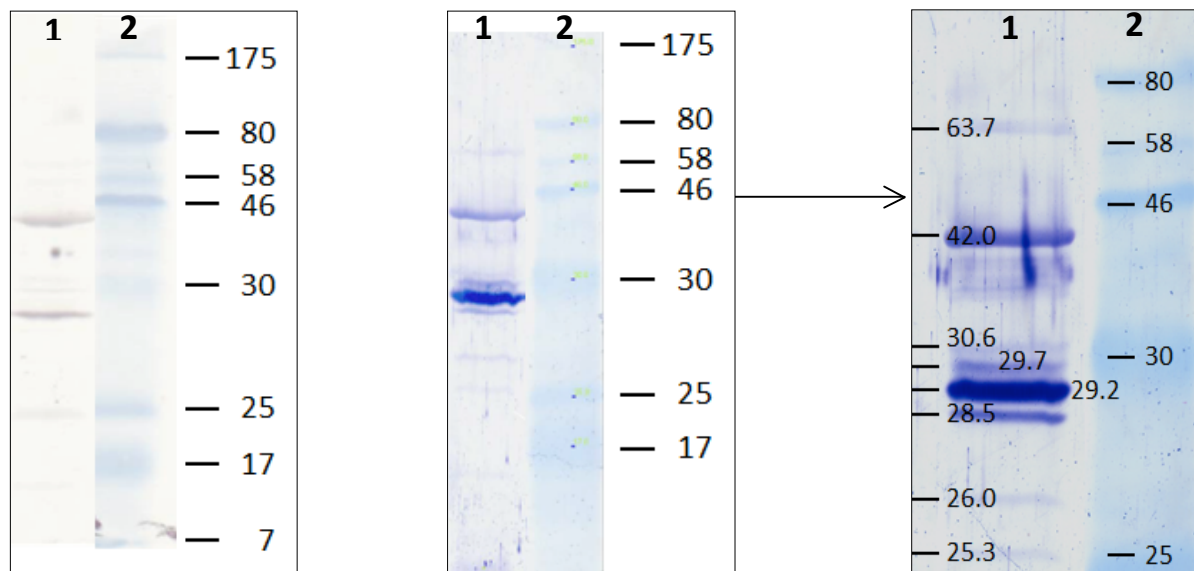


Abbildung 1. Untersuchung des Prä- und Postimmunisierungsserum einer Ziege (vor bzw. nach Immunisierung mit *C. burnetii*) im Western Blot. A. Spur 1: Präimmunisierungsserum; Spur 2: Molekulargewichtsstandard. B. Spur 1: Postimmunisierungsserum; Spur 2: Molekulargewichtsstandard. C. Vergrößerung aus Abb. 1B.

3.3 ELISA

Mit den OD_{450} -Werten der 13 Negativkontrollen wurde ein cut-off von 0.183 für die retrospektive Auswertung der ELISA-Daten der 61 Ziegenseran ermittelt. Als Grenzwert zur Unterscheidung von positiven und negativen Reagenten (cut-off = 0.183) diente der arithmetische Mittelwert der OD_{450} -Werte der Negativkontrollen (0.087) zuzüglich der dreifachen Standardabweichung (0.032×3). Im ELISA reagierten 13 der 61 Ziegenseran (21.3%) mit OD_{450} -Werten ≤ 0.183 und wurden daher als negativ eingeordnet. Die OD_{450} -Werte der übrigen 48 Seren (78.7%) überschritten den cut-off von 0.183 und waren als positiv zu bewerten.

3.4 Western Blot

Die Western Blot-Analyse der 61 Ziegenseran ergab eine hohe Diversität an Reaktionsmustern, die insgesamt drei Gruppen (Profilen) zugeordnet werden konnten. Die Gruppe der ELISA-negativen Seren wird dabei gesondert beschrieben. Keines der getesteten Seren reagierte mit dem BGM-Kontrollantigen.

Gruppe 1 umfasst 18 Seren, die innerhalb des Molekulargewichtsbereiches von 7-45 kDa mit einer unterschiedlichen Anzahl von Partialantigenen reagierten. Alle Seren wiesen eine deutliche Bande im Bereich von 41-45 kDa auf. Auffällig an dieser Gruppe ist, dass keine Seroreaktivität mit Partialantigen > 45 kDa nachweisbar war (Abb. 2 A, B).

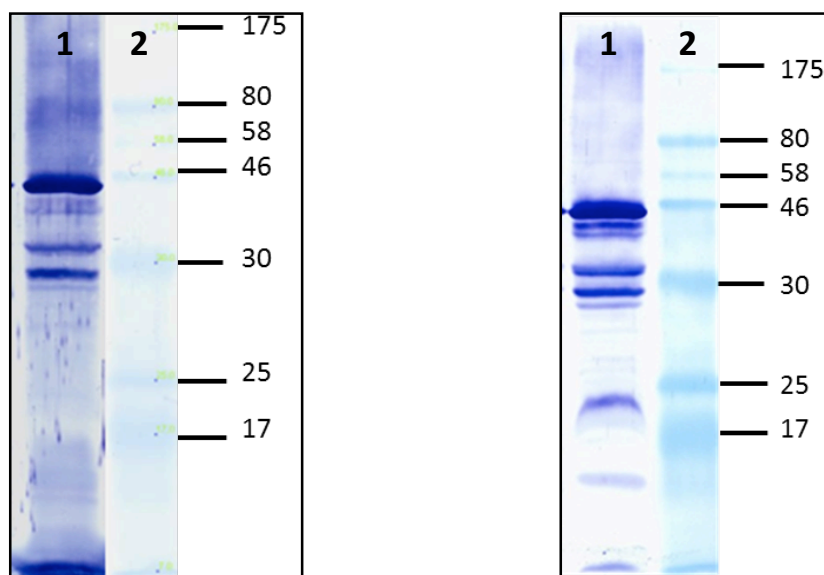


Abbildung 2 A und B. Western Blot-Reaktivität von zwei Ziegenseran der Gruppe 1. Spur 1: Serum; Spur 2: Molekulargewichtsstandard.

Gruppe 2 umfasst 27 Seren, die ebenfalls mit Partialantigenen von 7 bis 45 kDa reagierten und auch die deutliche Bande im Bereich von 41-45 kDa aufwiesen. Diese Seren reagierten zusätzlich mit Partialantigenen > 45 kDa, und zwar hauptsächlich zwischen 61-65 kDa und zwischen 71-75 kDa. Dieser Gruppe zugehörig ist auch das Serum der von uns immunisierten Ziege (1 Bande zwischen 61-65 kDa) (Abb. 3 A, B, C).

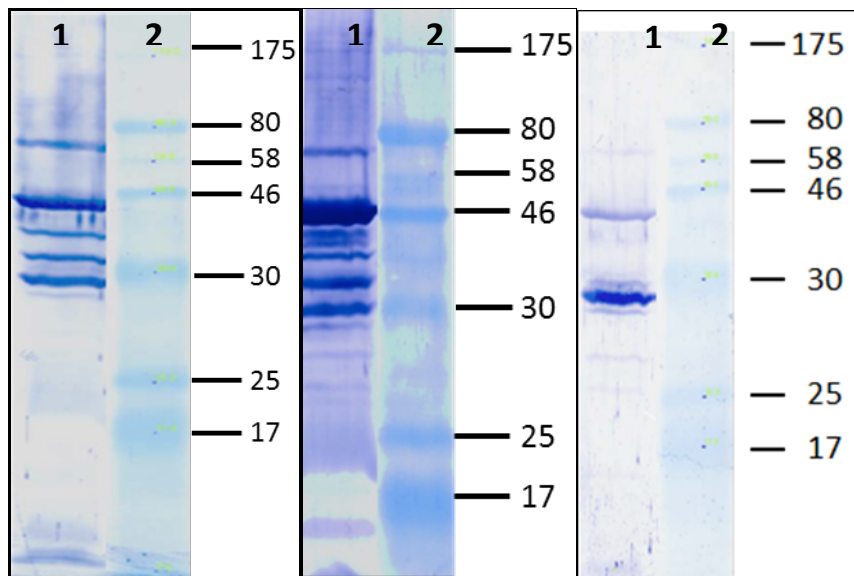


Abbildung 3 A, B und C. Western Blot-Reaktivität von drei Ziegenseren der Gruppe 2. Spur 1: Serum; Spur 2: Molekulargewichtsstandard

Gruppe 3 besteht aus 3 Seren, die alle zwischen 7-45 kDa Banden zeigen und dabei auch die deutliche Bande im Bereich von 41-45 kDa aufwiesen. Bei diesen Seren fand sich zusätzlich eine Bande zwischen 51-55 kDa (↖). Diese reaktive Bande war bei den Seren der Gruppen 1 und 2 nicht nachweisbar (Abb. 4).

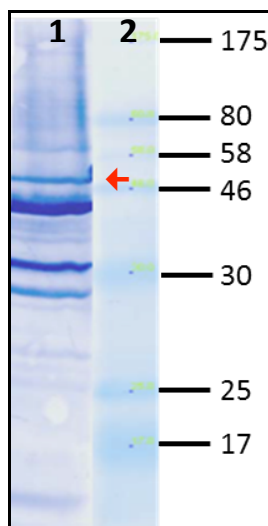


Abbildung 4. Western Blot-Reaktivität eines Ziegenserums der Gruppe 3. Spur 1: Serum; Spur 2: Molekulargewichtsstandard

ELISA-negative Seren

Von den 13 ELISA-negativen Ziegenseren zeigten 12 Seren im Western Blot schwache Seroreaktivitäten im Bereich von ca. 29 kDa bis ca. 70 kDa, insbesondere mit Partialantigenen der Grössen 68, 42, 39, 32 und 29 kDa. Ein Serum reagierte im Western Blot mit keinem Partialantigen (Abb. 5 A, B, C).

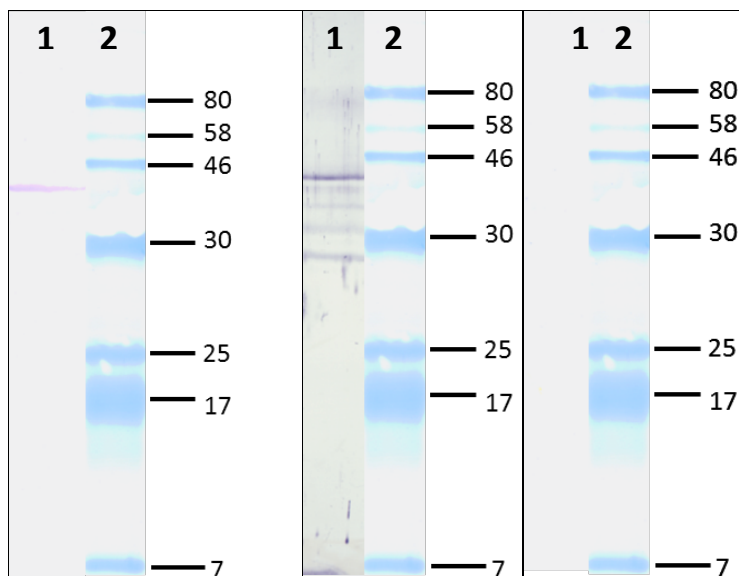


Abbildung 5 A, B und C. Western Blot-Reaktivität von ELISA-negativen Ziegenseren. Spur 1: Serum; Spur 2: Molekulargewichtsstandard

3.5 Reaktion mit BGM-Zellen

Keines der getesteten Seren reagierte mit den BGM-Zellen.

3.6 Vergleich von ELISA und Western Blot

An den 61 untersuchten Ziegenseren zeigte sich eine signifikante Korrelation zwischen der Höhe der ELISA-OD-Werte und der Western Blot-Reaktivität, i.e. der Anzahl der reaktiven Partialantigene ($r=0.709$, $p<0.001$). (Abb. 6)

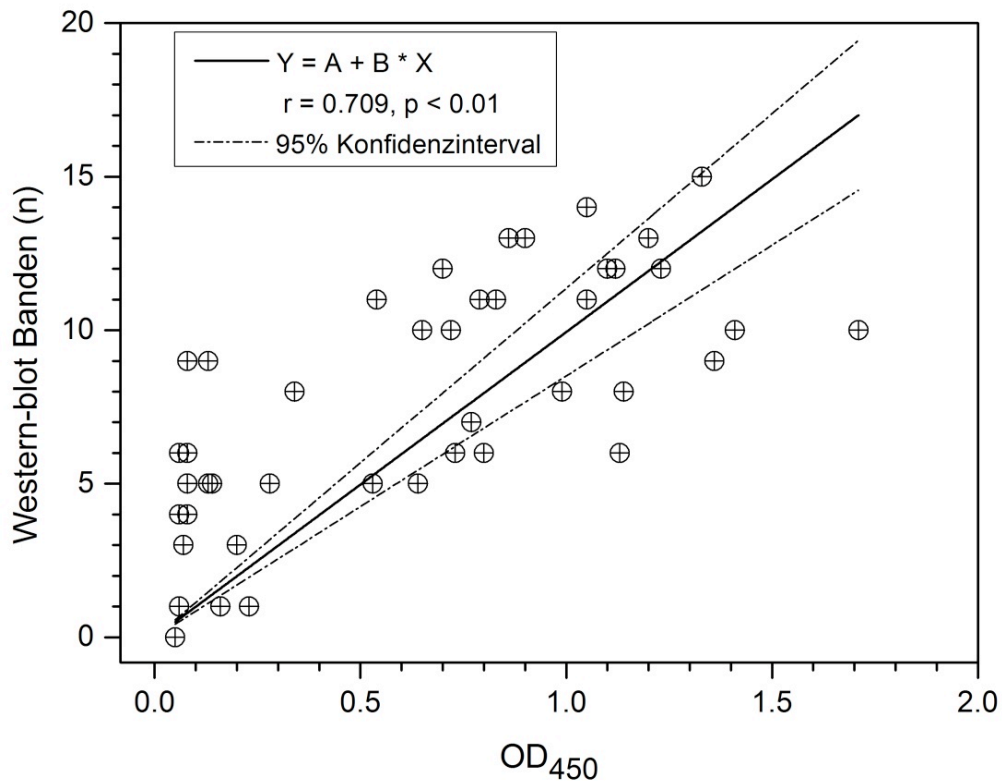


Abbildung 6. Vergleich von Western Blot und ELISA zur Untersuchung der humoralen Immunantwort von Ziegen gegen *C. burnetii*: Korrelation zwischen ELISA-OD-Werten und Anzahl der reaktiven Antigenbanden im Western Blot.

4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde die humorale Immunantwort von Ziegen mit einer natürlichen *Coxiella burnetii*-Infektion mittels Western Blot analysiert. Es sollte geprüft werden, ob im Western Blot reproduzierbare Bandenmuster nachweisbar sind, um damit die Grundlage zu einer zukünftig verbesserten Serodiagnostik der Coxiellose der Ziege zu legen.

Die Serodiagnostik ist ein wichtiges Werkzeug zur Diagnostik der Coxiellose der Haustiere. Es stehen hierbei verschiedene Nachweisverfahren zur Verfügung wie z.B. der IFT, die KBR oder der ELISA. Heute wird meist der ELISA durchgeführt, da hierfür standardisierte kommerzielle Testsysteme zur Verfügung stehen.

Ein Nachteil des ELISA ist, dass bisher lediglich partiell gereinigte Antigene von *C. burnetii* aus Zellkulturen oder embryonierten Hühnereiern in diesem Test eingesetzt werden können. Solche Antigengemische enthalten Rückstände der Wirtszellen. Dieser Umstand kann bei Tieren, die mit Virusimpfstoffen aus Zellkulturen geimpft wurden, dazu führen, dass unspezifische Seroreaktionen auftreten.

Die Validität von serologischen Tests wie dem ELISA ist zudem dadurch eingeschränkt, dass *C. burnetii* Antigenverwandtschaften zu anderen Bakterien und zu Viren aufweist. So sind serologische Kreuzreaktivitäten zwischen *C. burnetii* und *Bartonella vinsonii*, *Chlamydia trachomatis*, *Escherichia coli*, *Legionella micdadei*, *Rickettsia (R.) rickettsii* und *R. typhi* sowie zum Epstein-Barr-Virus und Cytomegalovirus bekannt (Musso 1997, Toman 2012, Kantsø 2009).

In der Tiermedizin wird der Nachweis von Antikörpern gegen *C. burnetii* durchgeführt, um die Seroprävalenz des Erregers in einzelnen Tierbeständen oder in Tierpopulationen zu ermitteln und aus diesen Daten Rückschlüsse auf eine mögliche Beteiligung von *C. burnetii* an Bestandserkrankungen, wie z.B. Fruchtbarkeitsstörungen oder gehäuften Aborten, zu ziehen. Die serologische Untersuchung singulärer Serumproben von Einzeltieren lässt keine Rückschlüsse auf das Infektionsstadium oder gar auf eine mögliche ursächliche Beteiligung von *C. burnetii* an einem Krankheitsgeschehen zu und ist daher ätiologisch nicht relevant.

In unseren Untersuchungen konnten wir Western Blot Reaktivitäten nachweisen, die reproduzierbare Bandenmuster ergaben. Diese Western Blot Reaktivität kann als *C. burnetii*-

spezifisch angesehen werden, da eine signifikant positive Korrelation mit den OD-Werten im ELISA vorliegt. Das Auftreten einzelner oder mehrerer reaktiver Banden im Western blot mit Seren von ELISA-negativ getesteten Tieren ist ein bekanntes inhärentes Phänomen des Western blot, wenn Antigene von Erregern verwendet werden, die aus Zellkulturen gereinigt werden müssen und somit immer auch eukaryotische Zellproteine enthalten. Um aus der nachgewiesenen *C. burnetii*-spezifischen Western Blot Reaktivität genau diejenigen Bandenmuster zu identifizieren, die reproduzierbar und spezifisch eine Infektion anzeigen, sind weiterführende Studien erforderlich.

Bislang ist in der Tiermedizin nicht bekannt, wie Seren von *C. burnetii*-infizierten landwirtschaftlichen Nutztieren im Western Blot reagieren. Experimentell infizierte Mäuse reagieren mit einer hochdifferenzierten humoralen Immunantwort: hier lassen sich Antikörperreaktivitäten gegen mindestens acht *C. burnetii*-Partialantigene mit Molekulargewichten von 14, 16, 21, 28, 32, 45-50, 57 und 60 kDa nachweisen (Zhang 2004).

Aus der Humanmedizin liegen Erfahrungen vor, die zeigen, dass es eine Reihe von definierten immundominanten *C. burnetii*-Antigenen gibt, die von Patienten immunologisch beantwortet werden. Es handelt sich dabei um sieben Antigene, die im Folgenden kurz beschrieben und mit den eigenen Western Blot Reaktionsmustern verglichen werden:

- 1) Ein 71 kDa Oberflächenprotein gehört zur Gruppe der Heat shock Proteine (Hsp), einer Gruppe hochkonservierter Proteine, die Hauptziele der humoralen und zellulären Immunantwort sind. Die Ähnlichkeit mit Hsps anderer Bakterien (wie *Legionella pneumophila*, *Francisella*, *E.coli*) liegt bei über 80% (Macellaro 1998). AK-Reaktivität gegen dieses Protein ist deshalb kaum *C. burnetii*-spezifisch. Es könnte sich dabei um das von uns in der Western Blot Gruppe 2 detektierte Protein handeln.
- 2) Ein 28 kDa Membranprotein, das ausschliesslich in *C. burnetii*-Isolaten aus Patienten mit akutem Q-Fieber gefunden wurde (Nine mile RSA493 u.a.). Dieses Antigen soll die serologische Unterscheidung von akutem und chronischem Q-Fieber ermöglichen (Zhang 2004). Es könnte sich um eines der von unseren Ziegenserien detektierten Proteine zwischen 28 und 30 kDa handeln. Allerdings sind im kDa-Bereich von 29.5-31 kDa auch andere Membranproteine bekannt, die als Hauptimmunogene gelten. Sie

konnten durch murine wie auch durch humane Antikörper im Immunoblot detektiert werden. Ob diese Proteine *C. burnetii*-spezifisch sind, ist nicht geklärt (Banjaree Bhatnagar 1996).

- 3) Zwei Proteine (Arginine repressor, 17.8 kDa; OmpH, 18.8 kDa), die im Western Blot ausschliesslich mit Seren von Endokarditispatienten reagieren (Sekeyova 2009). In diesem kDa-Bereich stellten wir in den Ziegenseran keine Seroreaktivität fest. Diese Proteine stellen bei Ziegen also keine immundominanten Antigene dar.
- 4) Drei Proteine, die im ELISA spezifisch mit humanen Seren von Patienten mit akutem Q-Fieber oder Q-Fieber Endokarditis reagieren (Elongation factor Tu 43 kDa, Hypothetical Protein 51.6 kDa, Omp 27.7 kDa) (Sekeyova 2010). Der 43 kDa EF-Tu, der in Phase I und Phase II exprimiert wird (Deringer 2010), könnte eines der Antigene im kDa-Bereich von 41-45 sein, mit denen unsere seropositiven Ziegenseran durchgängig eine deutliche Seroreaktivität aufwiesen. Das Protein mit 51.6 kDa könnte dem in der Gruppe 3 nachgewiesenen Protein entsprechen. Evt. wurden in dieser Western Blot Gruppe Ziegen erfasst, die sich in einem akuten Infektionsstadium befanden. Das Protein Omp mit 27.7 kDa könnte mit dem von Zhang (2004) (s.o.) beschriebenen Membranprotein übereinstimmen.

Ausgeprägte Immunreaktivität fand sich in der Arbeit von Deringer et al. (2010) im Bereich von ca. 25-70 kDa, wie wir es auch in unseren Versuchen festgestellt haben. Viele der von Deringer et al. (2010) in diesem Bereich identifizierten Proteine wiesen praktisch identische Molekulargewichtsgrößen auf und konnten nur durch 2-D-Gelelektrophorese als voneinander verschiedene Proteine identifiziert werden. Diese detaillierte Auftrennung und genaue Molekulargewichtsbestimmung von Proteinen ist mittels eindimensionalem Western Blot nicht möglich.

Durch den Vergleich der Proteome von Phase I und Phase II *C. burnetii* konnte gezeigt werden, dass sich Phase I- und Phase II-Coxiellen in der Proteinzusammensetzung unterscheiden: Bei Phase I-Coxiellen wurden 235 Proteine detektiert, wovon 78

phasenspezifisch sind, bei Phase II-Coxiellen wurden 215 Proteine detektiert, wovon 58 phasenspezifisch sind (Skultety 2011).

Wir können davon ausgehen, dass der von uns verwendete *C. burnetii*-Stamm Nine Mile überwiegend in der Phase II vorliegt, da dieser Stamm seit mindestens 20 Jahren nur in Zellkulturen bzw. im embryonierten Hühnerei vermehrt worden ist. Es ist jedoch nicht auszuschliessen, dass trotz langjähriger Passagen in Zellkulturen möglicherweise einzelne Phase I-Coxiellen vorhanden sind, die aber aufgrund ihrer geringen Anzahl nicht als Antigene wirksam sind.

Wir wissen nicht, in welchem Infektionsstadium sich die von uns getesteten Ziegen befanden. Das Infektionsstadium hat jedoch einen Einfluss auf die Western Blot Reaktivität, da sich die humorale Immunantwort gegen *C. burnetii* im Infektionsverlauf auch qualitativ verändert. So konnte im Western Blot mit humanen und bovinen Seren von Patienten in einem frühen Infektionsstadium, die den Western Blots mit den Seren von Patienten in einem späten Infektionsstadium gegenübergestellt wurden, beobachtet werden, dass mit fortschreitendem Infektionsstadium einzelne Proteinbanden im Western Blot stärker reagierten und dass zusätzliche Banden auftraten (Willems 1992). Humane Antiseren gegen Phase I und Phase II Proteine reagierten im Western Blot je nach Infektionsstadium unterschiedlich: Bei chronisch Infizierten dominieren Antikörper gegen Phase I Proteine über lange Zeit. Demgegenüber sind bei akut Infizierten Antikörper gegen diese Phase I Proteine etwa vier Monaten p. i. nicht mehr nachweisbar (Blondeau 1990).

Die qualitativen Unterschiede der Bandenmuster in den Western Blots mit unseren Ziegenserum, die wir 3 Reaktionsgruppen zugeordnet haben, könnten darauf beruhen, dass sich die Tiere in unterschiedlichen Infektionsstadien befanden. Um diese Frage beantworten zu können, müssten allerdings experimentelle Infektionen an Ziegen durchgeführt werden.

Technische Schwierigkeiten in der Vermehrung und Aufreinigung von *C. burnetii* sind der Hauptgrund dafür, dass es bisher keine umfangreicheren Studien zur humoralen Immunantwort von Tieren, z.B. von Ziegen, gegen diesen Infektionserreger gibt. Die Antigenausbeute aus Zellkulturen ist sehr gering, und zudem ist es äusserst schwierig, die *C. burnetii*-Partikel von Residuen der Wirtszellen vollständig zu trennen. Die kürzlich gelungene Vermehrung von *C. burnetii* in einem axenischen Nährmedium (Omsland et al. 2009) dürfte die Gewinnung hochreiner Antigene und damit auch serologische Studien etwa

an Nutztieren erheblich erleichtern. Die vorliegende Arbeit konnte durch den Nachweis spezifischer Western Blot-Reaktionsmuster einen Beitrag zu einer zukünftig verbesserten Serodiagnostik der Coxiellose der Ziege leisten.

5 Referenzen

Angelakis E., Raoult D. 2010: Q fever. *Vet. Microbiol.* 140: 297-309

Anonym: Robert Koch Institut RKI Ratgeber Infektionskrankheiten - Merkblätter für Ärzte 2002: Q Fieber. *Epidemiologisches Bulletin* Nr. 37, S. 313-316

Arens M. 1983: Kontinuierliche Vermehrung von *Coxiella burnetii* durch persistierende Infektion in Buffalo-Green-Monkey-(BGM)-Zellkulturen. *Zbl. Vet. Med. B* 30: 109-116

Banarjee Bhatnagar N, Bolt CR., Williams JC. 1996: Pore-forming activity of *Coxiella burnetii* outer membrane protein oligomers comprised of 29.5- and 31-kDa polypeptides. Inhibition of porin activity by monoclonal antibodies 4E8 and 4D6. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 23: 791, 378-401

Barron, A.C., C. Olshevsly, M.M. Cohen 1970: Characteristics of the BGM line of cells from the African Green Monkey kidney. *Arch. Gesamte Virusforsch.* 32, 389-392

Berri M., Rousset E., Champion J., Russo P., Rodolakis A. 2007: Goats may experience reproductive failures and shed *Coxiella burnetii* at two successive parturitions after a Q fever infection. *Res. Vet. Sci.* 83: 47-52

Blondeau J.M., Williams J.C., Marrie T.J. 1990: The immune response to phase I and Phase II *Coxiella burnetii* antigens as measured by western immunoblotting. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 590, 187-202

Bradford M. M. 1976: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-54

Brecht H., Hess E. 1964: Zur Epizootologie, Diagnostik und Bekämpfung des Q-Fiebers beim Rind. *Schweiz. Arch. Tierh.* 106, 389-399

Buhariwalla F., Cann B, Marrie T. J. 2009: A Dog-related outbreak of Q fever. *Clin. inf. dis.* 23: 753-755

BVET Coxiellose/Q-Fieber :

<http://www.bvet.admin.ch/themen/02794/02829/02855/index.html?lang=de>

Carcopino X, Raoult D, Bretelle F, Boubli L, Stein A. 2007: Managing Q fever during pregnancy: the benefits of long-term cotrimoxazole therapy. Clin. Infect. Dis. 45: 548-555

Carcopino X., Raoult D., Bretelle F., Boubi L., Stein A. 2009: Q fever during pregnancy. Ann. N.Y. Acad. Sci. 1166: 79-89

Cerf O., Condrón R. 2006: *Coxiella burnetii* and milk pasteurisation: an early application of the precautionary principle? Epidemiol. Infect. 134: 946-951

Deringer J., Chen C., Samuel J., Brown W. 2010: Immunoreactive *Coxiella burnetii* Nine Mile proteins separated by 2D electrophoresis and identified by tandem mass spectrometry. Microbiology 157, 526-542

Frazier M., Mallavia L., Samuel J., Baca O. 1990: DNA probes for the identification of *Coxiella burnetii* strains. Ann. N. Y. Acad. Sci. 590: 445-458

Hackstadt T. 1990: The role of lipopolysaccharides in the virulence of *Coxiella burnetii*. Ann. N. Y. Acad. Sci. 590: 27-32

Hackstadt T., Williams J. 1981: Biochemical stratagem for obligate parasitism of eukaryotic cells by *Coxiella burnetii*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 3240-3244

Hendrix LR, Samuel JE, Mallavia LP. 1991: Differentiation of *Coxiella burnetii* isolates by analysis of restriction-endonuclease-digested DNA separated by SDS-PAGE. J. Gen. Microbiol. 137(2):269-276.

Horchler H. 1987: Untersuchungen zum Vorkommen von *Chlamydia psittaci* im Genitaltrakt und Kot weiblicher Schlächtrinder, Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen der Tierärztlichen Hochschule Hannover, Hannover, S. 43, 50-51, 55, 56

- Hunninghaus J., Scherrer S., Schüpbach-Regula G., Wittenbrink M.M., Hamburger A., Stärk K., Magouras I. (in Vorbereitung): Prevalence of Q fever in small ruminants in Switzerland – implications for Public Health
- Kantsø B., Svendsen CB., Jørgensen CS., Krogfelt KA. 2009: Evaluation of serological tests for the diagnosis of rickettsiosis in Denmark. *J. Microbiol. Methods.* 2009 Mar;76(3):285-8
- Karakousis PC, Trucksis M, Dumler JS. 2006: Chronic Q fever in the United States. *J. Clin. Microbiol.* 44(6): 2283-2287
- Komiya T., Sadamasu K., Toriniwa H., Kato K., Arashima Y., Fukushi H., Hirai K., Arakawa Y. 2003: Epidemiological survey on the route of *Coxiella burnetii* infection in an animal hospital. *J. Infect. Chemother.* 9: 151-155
- Lindl T. 2000: Zell- und Gewebekultur. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg Berlin, S. 98-99, 103-104
- Little J., Kishimoto R., Canonico P. 1980: In vitro studies of interaction of rickettsia and macrophages: effect of ultraviolet light on *Coxiella burnetii* inactivation and macrophage enzymes. *Infect. Immun.* 27(3): 837-41
- Macellaro A, Tujulin E, Hjalmarsson K, Norlander L. 1998: Identification of a 71-kilodalton surface-associated Hsp70 homologue in *Coxiella burnetii*. *Infect. Immun.* 66(12): 5882-8.
- Marrie T. 1990: Q fever The disease. CRC Press: 23-37
- Marrie T., Mac Donald A., Durant H., Yates L., McCormick L. 1988: An outbreak of Q fever probably due to contact with a parturient cat. *CHEST* 93: 98-103
- Musso D., Raoult D. 1997: Serological cross.reactions between *Coxiella burnetii* and *Legionella micdadei*. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* : 208-212

- Omsland A., Cockrell D., Howe D., Fischer E., Virtaneva K., Sturdevant D., Porcella S., Heinzen R. 2009: Host cell-free growth of the Q fever bacterium *Coxiella burnetii*. PNAS 106: 4430-4434
- Rodolakis A. 2009: Q fever in dairy animals. Acad. Sci. 1166: 90-93
- Rousset E., Berri M., Duran B., Dufour P., Prigent M., Delcroix T., Touratier A., Rodolakis A. 2009 : *Coxiella burnetii* shedding routes and antibody response after outbreaks of Q fever induced abortion in dairy goat herds. Appl. Environ. Microbiol. 75 : 428-433
- Samuel J., Frazier M., Mallavia L. 1985: Correlation of plasmid type and disease caused by *Coxiella burnetii*. Infect. Immun. 49(3): 775-779
- Sánchez J., Souriau A., Buendía A., Arricau-Bouvery N., Martínez C., Salinas J., Rodolakis A., Navarro J. 2006: Experimental *Coxiella burnetii* infection in pregnant goats: a histopathological and immunohistochemical study. J. Comp. Pathol. 135(2-3): 108-115.
- Sanford S., Josephson G., MacDonald A. 1994: *Coxiella burnetii* (Q fever) abortion storms in goat herds after attendance at an annual fair. Can. Vet. J. 35: 376-378
- Sekeyova Z., Kovacova E. 2006: Identification and characterization of *Coxiella burnetii* strains and isolates using monoclonal antibodies. Ann. N. Y. Acad. Sci. 1078: 557-560
- Sekeyova Z., Kowalczywska M., Decloquement P., Pelletier N., Spitalska E., Raoult D. 2009 : Identification of protein candidates for the serodiagnosis of Q fever endocarditis by an immunoproteomic approach. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 28, 287-295
- Sekeyova Z., Kowalczywska M., Vincentelli R., Decloquement P., Flores-Ramirez G., Skultety I., Raoult D. 2010: Characterization of antigens for Q fever serodiagnostics. Acta virol. 54: 173-180
- Seshadri R., Paulsen I., Eisen J., Read T., Nelson K., Nelson W., Ward N., Tettelin H., Davidsen T., Beanan M., Deboy R., Daugherty S., Brinkac L., Madupu R., Dodson R., Khouri H., Lee K., Carty H., Scanlan D., Heinzen R., Thompson H., Samuel J., Fraser C., Heidelberg J. 2003: Complete

genome sequence of the Q-fever pathogen *Coxiella burnetii*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100: 5455-5460

Skultety L., M. Hajduch, G. Florez-Ramirez, J.A. Miernyk, F. Ciampor, R. Toman, Z. Sekeyova 2011 : Proteomic comparison of virulent phase I and avirulent phase II of *Coxiella burnetii*, the causative agent of Q fever. J. Prot. 74(10): 1974-84

Tissot-Dupont H., Thirion X., Raoult D. 1994: Q fever serology: cutoff determination for microimmunofluorescence. Clin. Diagn. Lab. Immun. 1: 189-196

Toman R., Heinzen R.A., Samuel J.E., Mege J. 2012: *Coxiella burnetii*: recent advances and new perspectives in research of the Q fever bacterium. AEMB 984: 121, 347

Waldhalm D., Stoenner H., Simmons R., Thomas L. 1978: Abortion associated with *Coxiella burnetii* infection in dairy goats. JAVMA 173: 1580-1581

Willems H., Thiele D., Glas-Adollah-Baik M., Krauss H. 1992: Immunoblot technique for Q fever. Eur. J. Epidemiol. 0392-2990, 103-107

Wittenbrink M. M. 2009: Q-Fieber-Ausbruch in den Niederlanden: Relevanz für die Schweiz. Schweizer Zoonosebericht BVET 2009: 8-11

Zhang G., Kiss K., Seshadri R., Hendrix L., Samuel J. 2004: Identification and Cloning of immunodominant antigens of *C. burnetii*. Infect. Immun. 2004: 844-852

Danksagung

Ich bedanke mich herzlich bei Herrn Prof. Dr. M. M. Wittenbrink für die Überlassung des Themas und die jederzeit freundlich gewährte Unterstützung.

Herrn Prof. Dr. Ulrich Bleul danke ich für die Übernahme des Korreferats.

Grosser Dank geht auch an Simone Scherrer, Brigitte Sigrist und Daniel Frei vom Institut für Veterinärbakteriologie für ihre Hilfsbereitschaft.

Allen weiteren Mitarbeitern des Instituts für Veterinärbakteriologie sei gedankt für die Einarbeitung und das freundliche Arbeitsklima während meiner Dissertation.

Curriculum Vitae

Vorname Name: Annina Fröhlich

Geburtsdatum: 14.9.1985

Geburtsort: Zürich ZH

Nationalität: CH

Heimatort: Brugg AG

August 1992-Juli 1998 Primarschule Küsnacht, Schweiz

August 1998-Juli 2000 Sekundarschule Küsnacht, Schweiz

August 2000-August 2004 Gymnasium Kantonsschule Küsnacht, Schweiz

27. August 2004 Matura, Gymnasium Kantonsschule Küsnacht, Schweiz

Oktober 2005-Oktober 2010 Studium Veterinärmedizin an der Vetsuisse-Fakultät,
Universität Zürich, Schweiz

14. Oktober 2010 Staatsexamen, Vetsuisse-Fakultät, Universität Zürich,
Schweiz

März 2011-Juli 2013 Anfertigung der Dissertation
unter Leitung von Prof. Dr. med. vet. M. M. Wittenbrink
am Institut für Veterinärbakteriologie
der Vetsuisse-Fakultät Universität Zürich
Direktor: Prof. Dr. med. vet. M. M. Wittenbrink

Seit April 2012 Assistenz in der Kleintierpraxis Schwäntenmos, Dr.med.vet
M. Minder, Zumikon, Schweiz

Anhang: Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
A. bidest	Aqua bidest
BGM	Buffalo green monkey
CPE	Cytopathogener Effekt
ELISA	Enzyme-linked-immunosorbent-assay
Fa.	Firma
i.e.	lat., it est, das ist
IFT	Immunfluoreszenztest
KBR	Komplementbindungsreaktion
LPS	Lipopolysaccharid
p.i.	post infectionem
s.	lat., sive, oder
TBS	Tris buffered saline
Tris	Tris-hydroxy-methyl-aminomethan
